

0719552-1

На правах рукописи

БЕРЕЗИНСКИЙ Леонид Александрович

**ЭКОТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
НОВОГО КЛАССА ИНГИБИТОРОВ ХОЛИНЭСТЕРАЗ –  
ТЕТРААЛКИЛАММОНИЕВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ УРАЦИЛА  
НА БАТАРЕЕ БИОТЕСТОВ**

Специальность 03.00.16 – Экология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук



Казань 2000

Диссертационная работа выполнена в лаборатории химико-биологических исследований ИОФХ им. А.Е. Арбузова КНЦ РАН и на кафедре прикладной экологии Казанского государственного университета.

Научный руководитель: Кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник **Зобов В.В.**

Научный консультант: Доктор химических наук,  
профессор **Латыпова В.З.**

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КФУ



**870073**

**Гайнутдинов Х.Л.**

Кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник **Сабиров Р.М.**

Ведущее учреждение – Институт биологии внутренних вод им. И.Д.

Паланина РАН, Борок

Защита диссертации состоится « 14 » ДЕКАБРЯ 2000 г.

в 13 часов на заседании диссертационного совета К 053.29.24 при Казанском государственном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного университета.

Автореферат разослан « 13 » НОЯБРЯ 2000 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор химических наук, доцент

Евтюгин Г.А.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** К числу ведущих токсикантов окружающей среды относятся ингибиторы холинэстераз, составляющие основное ядро ядов сельскохозяйственной (пестициды) и военной химии. В настоящее время холинэстеразы и их ингибиторы продолжают привлекать особое внимание ученых в связи с целенаправленным конструированием нового поколения высокоселективных пестицидов, малотоксичных для млекопитающих (Кабачник и др., 1965; Михельсон, Зеймаль, 1970; Резник и др., 1998). Кроме того, интенсивно производится поиск тест-объектов с целью создания альтернативных методов оценки эколого-токсикологической обстановки с привлечением представителей иных, нежели млекопитающие, таксономических групп (Тонкопий и др., 1993).

В конце 80-х годов в лаборатории химико-биологических исследований (ХБИ) Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова (ИОФХ) были синтезированы производные урацила, содержащие тетраалкиламмониевые группы при  $N_1$  и  $N_3$  атомах пиримидинового цикла, классифицированные, в дальнейшем, как новый класс необратимых и высокоселективных ингибиторов ацетилхолинэстеразы (АХЭ; НФ 3.1.1.7) (табл.1., формулы 1 и 3). Существенной особенностью их строения является наличие в составе молекулы урацильной структуры, с которой связывают антитоксические и адаптогенные и специфические свойства пиримидин-содержащих веществ по отношению к млекопитающим (Аникиенко и др., 2000; Камилов и др., 1992).

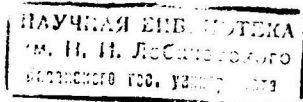
Необычно высокий для ингибиторов АХЭ индекс безопасности (широта эффективного действия,  $ШЭД = LD_{50}/ED_{50} \geq 30$ ) в опытах *in vivo* на крысах (и мышах) позволяет рассматривать тетраалкиламмониевые производные 6-метилурацила в качестве перспективного класса агентов, на базе которых могут быть созданы высокоизбирательные пестициды, менее ток-

сичные для млекопитающих, чем фосфорорганические соединения (ФОС) (Зобов и др., 1998). Поэтому весьма актуальной задачей является оценка токсикометрических характеристик этого нового класса ингибиторов холинэстеразы на батарее биотестов, составленной из представителей разных таксономических групп, входящих в природные экосистемы (от гидробионтов до млекопитающих).

**Целью** данной работы является определение биологической активности некоторых тетраалкиламмониевых производных урацила в батарее биотестов «гидробионты-млекопитающие».

В связи с этим решались следующие **задачи**:

1. Оценить острую токсичность известных холиноблокаторов, холинометиков и антихолинэстеразных агентов методом биотестирования на лабораторной культуре *Daphnia magna*.
2. Дать сравнительную оценку острой токсичности тетраалкиламмониевых производных урацила на *Daphnia magna* и мышах; выявить зависимость «химическая структура - токсичность» в ряду химических гомологов.
3. Оценить острую токсичность наиболее активных тетраалкиламмониевых производных 6-метилурацила в батарее биотестов «Algotoxkit F<sup>TM</sup> (*Selenastrum capricornutum*) - Rotokit F (*Brachionus calyciflorus* - Thamnotokit F (*Thamnocephalus platyurus*) - Protokit F<sup>TM</sup> (*Tetrachymena thermophila*) - лабораторная культура *Paramecium caudatum*».
4. Определить антиферментную активность 1,3-бис{ω-(диэтил-орто-нитробензиламмоний)пентил}-6-метилурацил дибромида (соед. № 547) в отношении холинэстеразы *Daphnia magna*.
5. Провести фармакологический анализ механизма токсического действия соед. № 547 на *Daphnia magna* с помощью холинотропных агентов с известным механизмом действия.





6. Определить параметры хронической и специфической токсичности различных концентраций (1/3-1/100 от ЛК<sub>50</sub>) соед. № 547 методом биотестирования на лабораторной культуре *Daphnia magna*.

**Научная новизна работы.** Впервые получена сравнительная токсиметрическая характеристика 28 представителей нового класса ингибиторов холинэстераз на батарее биотестов «гидробионты (водоросли, простейшие, коловратки, ракообразные) – млекопитающие (мыши)»: показано, что острая токсичность некоторых новых соединений на дафниях в 10000 раз уступает острой токсичности параоксона и в 5 раз – острой токсичности прозерина; показаны различия в требованиях к молекулярному устройству высокоэффективных представителей новых соединений на гидробионтах и мышах; выявлено, что взаимодействие одного из активных представителей ряда – соед. №547 с холинэстеразным и холинорецепторным аппаратом дафний не играет существенной роли в токсикогенезе. Определено место представителей нового класса ингибиторов холинэстераз в ряду известных холинотропных токсикантов: «параоксон (0.001 мкМ/л) – прозерин (2.7 мкМ/л) – изученные тетраалкиламмониевые производные урацила (2.5 – 400 мкМ/л) – изо-ОМПА (1000 мкМ/л)».

**Научно-практическая ценность.** Проведенное в работе ранжирование изученных тетраалкиламмониевых производных урацила по уровню эколого-токсикологической опасности и определение приемлемых для биоты нормативных концентраций в природной среде может быть использовано при конструировании нового поколения высокоселективных пестицидов.

Результаты работы используются в учебном процессе экологического факультета КГУ при чтении общепрофессионального курса «Организм и среда» и специального курса «Экологическая токсикология».

Диссертация выполнена на базе лаборатории ХБИ ИОФХ и кафедры прикладной экологии Казанского государственного университета

(КГУ) в рамках госбюджетной темы «Развитие теоретических и прикладных основ экологического мониторинга» (№ ГР 0/98006937), а также по гранту АН РТ № 22-07/99 (Ф).

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Классификация изученных представителей тетраалкиламмониевых производных урацила по степени их опасности для *Daphnia magna* и определение места этих соединений в ряду известных холинотропных агентов.
2. Характеристика связи «химическая структура – токсичность» в ряду тетраалкиламмониевых производных урацила на батарее биотестов «гидробионты-млекопитающие».
3. Анализ характера взаимодействия 1,3-бис{ω-(диэтил-орто-нитробензиламмоний)пентил}-6-метилурацил дибромида (соед. № 547) с холинэстеразным и холинорецепторным аппаратом дафний.
4. Характеристика хронической и специфической токсичности 1,3-бис{ω-(диэтил-орто-нитробензиламмоний)пентил}-6-метилурацил дибромида (соед. № 547) в 4-х последовательных поколениях (P-F<sub>1</sub>-F<sub>2</sub>-F<sub>3</sub>) *Daphnia magna*.

**Апробация работы.** Основные результаты диссертационной работы доложены на итоговой научной конференции ИОФХ КНЦ РАН (Казань, 1999), на итоговой научной конференции КГУ (Казань, 1999), VI и VII Всероссийских школах молодых ученых «Актуальные проблемы нейробиологии» (Казань, 1999, 2000), IV и V Всероссийских научно-практических конференциях «Новое в экологии и безопасности жизнедеятельности» (Санкт-Петербург, 1999, 2000).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 9 научных работ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация объемом 155 страниц состоит из введения, обзора литературы, 3 глав, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Список цитируемой литературы включает 220 источников, из них 135 - на иностранных языках. Диссертация содержит 27 рисунков и 11 таблиц.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На лабораторной культуре *Daphnia magna* проводилась оценка параметров острой токсичности (ЛК<sub>50</sub> при 24-48 часов наблюдения) следующих индивидуальных химических соединений: армин (Россия), прозерина метилсульфат (Россия), физостигмина салицилат (Россия), изо-ОМПА (Россия), ГД-42 (Россия), ацетилхолина хлорид (Sigma), карбахолина хлорид (Россия), d-тубокурарина хлорид (Otioп), амизила гидрохлорид (Россия), атропина сульфат (Россия), дитилина дийодметилат (Россия), декаметония хлорид (Россия), 6-метилурацил (Россия), тетраэтиламмония бромид (ТЭА) (Россия).

Также на *Daphnia magna* была исследована острая токсичность моно-, бис-тетраалкиламмониевых производных урацила (всего 28 соединений) и тиофосфонового производного 6-метилурацила (соед. № 729), химические структуры приведены в таблице 1.

Оценка острой токсичности синтезированных производных урацила проводилась на 780 белых беспородных мышах обоего пола массой 17-22 грамм при внутрибрюшинном (в/б) способе введения.

Биотестирование эффективности некоторых из синтезированных производных урацила проводилась на: 1) ракообразных – *Daphnia magna* (лабораторная культура) и *Thamnocephalus platyurus* (Thamnotoxkit F) (Методика определения..., 1999; РД, 1991; Thamnotoxkit F, 1995); 2) водорослях - *Selenastrum capricornatum* (Algotoxkit F<sup>TM</sup>, 1996); 3) простейших - *Paramecium caudatum* (лабораторная культура) и *Tetrachymena thermophila*

(Prototoxkit F<sup>TM</sup>) (РД, 1991; Prototoxkit F<sup>TM</sup>, 1998); 4) коловратках - *Brachionus calyciflorus* (Rotoxkit F, 1999).

При проведении экспериментов на гидробионтах использовалась «биологизированная» аквариумная вода с оптимальным рН, населенная биотой и насыщенная кислородом (Методика выполнений ...,1997).

Опыты по определению хронической токсичности соед. №547 проводили на лабораторной культуре *Daphnia magna* в возрасте до 24 часов в стандартных условиях (РД, 1991).

Исследование влияния соед № 547 на активность АХЭ гомогената *Daphnia magna* проводилось по методу Элмана.(Ellman et al, 1961). Концентрация белка в пробе определялась по методу Брэдфорда (Bradford et al, 1976).

Для определения острого токсического действия рассчитывали ЛК(Д)<sub>50</sub> [E(I)C<sub>50</sub>] и ее доверительные границы (CL – confidence limits). Расчет проводился методом Литчфилда-Уилкоксона в модификации Рота (Беленький, 1963) с помощью специального пакета программ статистической обработки данных на ПЭВМ. Для определения достоверности различий средних значений двух выборок использовали t-критерий Стьюдента с уровнем значимости  $p < 0.05$ . Статистическую обработку производили с помощью программы Microsoft Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Оценка острой токсичности известных холинотропных агентов на дафниях и мышах.** Перед исследованием биологической активности представителей нового класса ингибиторов холинэстераз нами была проведена серия экспериментов по установлению токсикометрических параметров известных ингибиторов холинэстераз, холиномиметиков и холинолитиков на *Daphnia magna*. Данный этап исследования был принят нами с целью определения места тетраалкиламмониевых произ-

водных урацила в ряду известных токсикантов и классификации уровня их относительной эколого-токсикологической опасности (рис.2.).

Симптоматика поражения *Daphnia magna* всеми изученными ингибиторами холинэстераз (в том числе производными урацила), а также холиномиметиками концентрационно-зависима и в целом аналогична наблюдаемой на мышах – гиперактивность, иммобилизация и последующая гибель. Уровень токсичности холиномиметиков (анабазин, цитизин, ацетилхолин, карбохолин и лобелин) значительно ниже токсичности ингибиторов холинэстеразы ( $ЛК_{50}^{48} = 2,7-120.0$  мкМ/л и  $ЛК_{50}^{48} = 0,0005-0,78$  мкМ/л, соответственно). На действие холинолитиков дафнии реагировали иммобилизацией без «судорожной» стадии; различий в эффективности М-или Н-холинолитиков не отмечалось.

Результаты сравнительного анализа токсикометрических данных, полученные в рядах известных холинотропных агентов (ингибиторы холинэстераз, холиномиметики, холинолитики, n=27 шт.) на дафниях и мышах, показали отсутствие корреляции между ними.

Полученные результаты сравнительно-токсикологического исследования позволяют следующим образом выстроить относительную шкалу среднесмертельных концентраций ( $ЛК_{50}^{48}$ ) изученных агентов: «параоксон ( $ЛК_{50}^{48}=0.0008$  мкМ/л ) - дихлофос ( $ЛК_{50}^{48}=0.0018$  мкМ/л ) – прозерин ( $ЛК_{50}^{48}=2.7$  мкМ/л) – декаметоний ( $ЛК_{50}^{48}=17.2$  мкМ/л ) – атропин ( $ЛК_{50}^{48}=335.8$  мкМ/л ) – изо-ОМПА ( $ЛК_{50}^{48}=915.2$  мкМ/л )».

**Оценка острой токсичности тетраалкиламмониевых производных урацила на дафниях и мышах.** Элементарные структурные составляющие соединений - 6-метилурацил, тетраэтиламмония бромид (ТЭА), а также бис-триэтилпентиламмониевое производное 6-метилурацила (соед. А-1) практически нетоксичны для дафний -  $ЛК_{50}^{48} > 1$  г/л (8000.0 мкМ/л),  $ЛК_{50}^{48} =$

957.0 (730.0 ÷ 1263.0) мкМ/л и  $LK_{50}^{48} = 935.0$  (719.0 ÷ 1215.0) мкМ/л, соответственно.

Замена двух этильных радикалов в бис-триэтилпентиламмониевом производном 6-метилурацила (соед. А-1) на два бензильных (соед. № 416, табл. 1.) ведет к увеличению токсичности на дафниях в 10 раз, на мышах среднесмертельные дозы достоверно не различимы ( $p < 0.05$ ) (табл.1.).

Анализ результатов, приведенных в таблице 1, показывает, что наиболее токсичными на дафниях оказались соединения, имеющие в бензильном радикале орто- $NO_2$  заместители.

Кроме того, при увеличении длины полиметиленовой цепочки в 5-ом положении урацилового цикла с  $R_2=H$  (соед. №547) до  $C_4H_9$  (соед. №858),  $C_{10}H_{21}$  (соед. №846) и  $C_{16}H_{33}$  (соед. №853) отмечена тенденция к увеличению токсичности до 2-7 крат по сравнению с токсичностью соед. № 547. Вероятно, это связано с широко известным феноменом повышения общей липофильности и токсичности молекулы при введении углеводородных радикалов (Альберт, 1989), что влечет за собой «пробой» гистогематического барьера дафний и рост общетоксических нарушений непосредственно в биофазе.

Переход от ароматического 6-метилурацилового цикла в молекуле соед. № 547 к деформированной плоскости барбитурового цикла в молекуле соед. № 716 не сопровождается достоверным изменением токсичности соединения как на дафниях, так и на мышах (табл. 1., формула 1.). Токсичность на мышах в противоположность данным, полученным на дафниях, с увеличением длины полиметиленовой цепочки уменьшается в ряду: соед. № 547 ( $LD_{50} = 1.2$  мкМ/кг) – соед. № 858 ( $LD_{50} = 1.3$  мкМ/кг) – соед. № 846 ( $LD_{50} = 10.8$  мкМ/л) – соед. № 853 ( $LD_{50} = 39.7$  мкМ/кг) (табл.1.).

Таким образом, анализ результатов биотестирования выявил существенные расхождения в требованиях к молекулярному устройству бис-четвертичных соединений, токсичных на дафниях и на мышах. Средне-

смертельные концентрации всех изученных бисчетвертичных структур (21 соединение) для дафний находятся в диапазоне 2.5 - 404.9 мкМ/л; среднесмертельные дозы этих же соединений для мышей изменяются в диапазоне 0.80 – 39.7 мкМ/кг и находятся на уровне прозерина и эзерина -  $LD_{50}=2.3$  и 3.9 мкМ/кг соответственно.

Изученные 3-( $\omega$ -бензилдиэтиламмонио-алкил)урацилы несколько уступали токсичности своих 1- $\omega$ -бензилдиалкиламмонииоалкильных аналогов. Их токсичность характеризуется  $LD_{50}=54.0-94.0$  мкМ/л (табл.1., формулы 2 и 3).

Наиболее важное наблюдение при сравнении двух групп моноониевых структур заключается в том, что различие в токсичности соед. № 627 и № 857 для дафний статистически недостоверно (при  $p<0.05$ ), тогда как для мышей наблюдается существенная (23-кратная) разница в среднесмертельных дозах данных соединений (табл. 1.). Также следует отметить, что токсичность моноониевых производных 6-метилурацила №№ 627 и 857 в 3.2 – 3.4 раза уступает токсичности их бисониевого аналога – соед. №547 на дафниях. Таким образом, местоположение тетраалкиламмониевой группировки при  $N_1$  или  $N_3$  атомах урацилового цикла не имеет значения для токсичности соединений на дафниях и весьма существенно для токсичности соединений на мышах.

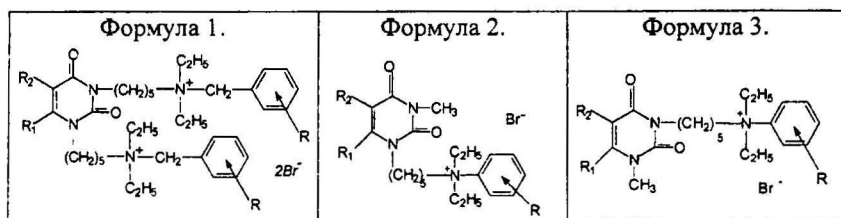
Среднесмертельные концентрации всех семи изученных моноониевых производных урацила на дафниях находятся в диапазоне 43.4 – 228.5 мкМ/л, среднесмертельные дозы этих же соединений на мышах находятся в диапазоне 2.3 – 60.3 мкМ/кг.

Соед. № 729, имеющее вместо бензилдиэтилпентиламмониевого фрагмента в  $N_3$ -положении урацилового цикла тиофосфоновой фрагмент, проявило на дафниях существенно более высокую токсичность, чем любой из изученных нами бис- или моноониевых производных урацила (табл. 1). Так, токсичность соед. № 729 характеризуется величиной  $ЛК_{50}^{48}=0.012$

мкМ/л, что в 200 - 650 раз токсичнее самых активных тетраалкиламмониевых производных урацила (соед. №№ 858, 846, 853), имеющих  $ЛК_{50}^{48}=2.5 - 7.7$  мкМ/л. Возможно, это связано с более высокой липофильностью тиофосфоновой головки, обеспечивающей высокую проникающую способность соединений через систему гисто-гематических барьеров дафний (Тонкопий и др., 1993; 1994).

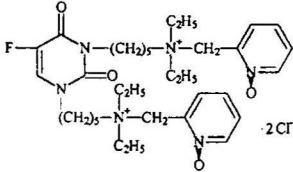
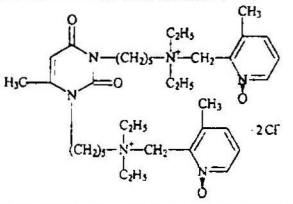
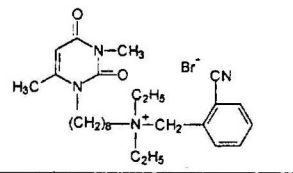
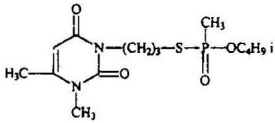
Таблица 1.

Химическое строение тетраалкиламмониевых производных урацила и их токсичность на *D. magna* и мышах



№ п.п.	формула	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R	ЛК <sub>50</sub> <sup>48</sup> на <i>D.magna</i> (мкМ/л)	ЛД <sub>50</sub> на мышах (мкМ/кг)
A1					<b>935.0</b> (719.0+1215.0)	<b>1.7</b> (1.3 + 2.2)
416	I	CH <sub>3</sub>	H	H	<b>95.0</b> (72.5-124.4)	<b>2.0</b> (1.5 + 2.6)
547	I	CH <sub>3</sub>	H	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	<b>18.7</b> (14.6 + 23.9)	<b>1.2</b> (0.9 + 1.5)
558	I	CH <sub>3</sub>	H	<i>o</i> -Br	<b>19.4</b> (13.8 + 27.4)	<b>1.1</b> (0.8 + 1.5)
716					<b>29.3</b> (22.4 + 38.4)	<b>2.6</b> (1.9 + 3.3)
731	I	H	H	<i>o</i> -CN	<b>186.6</b> (130.5 + 266.8)	<b>1.9</b> (1.3 + 2.7)
732	I	H	H	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	<b>79.7</b> (60.4 + 105.3)	<b>1.9</b> (1.1 + 2.5)
735	I	CH <sub>3</sub>	H	<i>o</i> -I	<b>22.6</b> (15.0 + 33.8)	<b>2.0</b> (1.3 + 2.9)
736	I	CH <sub>3</sub>	Bz	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	<b>11.4</b> (9.4+13.8)	<b>1.1</b> (0.8+1.2)
738	I	CH <sub>3</sub>	H	<i>o</i> -CN	<b>200.7</b> (147.6 + 273.0)	<b>1.5</b> (1.1 + 2.0)



744	I	H	CN	<i>m</i> -CN	205.1 (145.4 + 289.1)	1.4 (1.0 + 2.0)
746	I	H	F	<i>m</i> -CN	103.4 (78.9 + 135.5)	2.0 (1.5 + 2.6)
792	I				404.9 (309.1 + 530.4)	8.1 (6.2 + 10.6)
805	I	CH <sub>3</sub>	H	<i>o</i> -SCN	113.4 (80.4 + 160.0)	3.4 (2.4 + 4.8)
809	I	CH <sub>3</sub>	H	<i>p</i> -SO <sub>2</sub> F	49.4 (37.4 + 65.2)	3.2 (2.4 + 4.3)
821	I	CH <sub>3</sub>	H	3,4 (-CH <sub>2</sub> O-)	117.3 (82.1 + 167.8)	1.0 (0.7 + 1.5)
822	I				279.0 (218.0 + 357.0)	10.5 (8.2 + 13.4)
834	I	CH <sub>3</sub> O	H	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	137.5 (107.4 + 176.0)	0.8 (0.6 + 1.0)
858	I	CH <sub>3</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	7.8 (6.0 + 10.1)	1.3 (1.0 + 1.7)
846	I	CH <sub>3</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	4.0 (3.1 + 5.2)	10.8 (8.3 + 14.0)
853	I	CH <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	2.5 (2.0 + 3.2)	39.7 (31.1 + 50.9)
627	II	CH <sub>3</sub>	H	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	58.9 (44.6 + 77.7)	60.3 (45.7 - 79.6)
711	II				228.5 (159.8 + 326.8)	4.8 (3.4 + 6.9)
849	II	CH <sub>3</sub>	Cl	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	96.0 (72.6 + 126.6)	15.0 (11.4 + 19.9)
859	II	CH <sub>3</sub>	Br	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	43.4 (31.0 + 60.7)	26.0 (18.6 + 36.4)
857	III	CH <sub>3</sub>	H	<i>o</i> -NO <sub>2</sub>	64.3 (47.3 + 87.5)	2.6 (1.9 + 3.6)
864	III	CH <sub>3</sub>	H	2-F 6-NO <sub>2</sub>	94.2 (71.3 + 124.3)	2.3 (1.8 + 3.1)
865	III	CH <sub>3</sub>	H	2-NO <sub>2</sub> 4-N <sub>3</sub>	54.1 (38.4 + 76.3)	3.7 (2.6 + 5.2)
729					0.012 (0.009 + 0.015)	0.72 (0.56 - 0.92)

Проведенный корреляционный анализ токсикометрических характеристик тетраалкиламмониевых производных урацила на дафниях и мышах выявил отсутствие корреляции и диаметрально различные структурные требования к молекулярному устройству молекул, токсичных для представителей данных таксономических групп животных (рис. 1.).

Соед. №547 (одно из наиболее эффективных соединений для млекопитающих) и соед. №853 (наиболее токсичное соединение на дафниях) приближаются по уровню токсичности на дафниях к ониевому карбамату прозерину, в 3.500 - 25.000 раз уступая токсичности параоксона (рис. 2.).

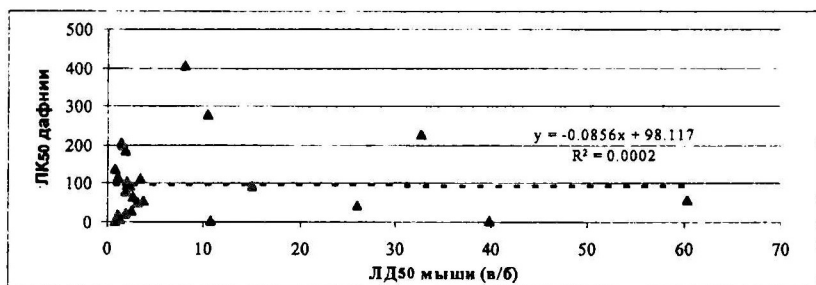


Рис. 1. Сопоставление величин  $LC_{50}^{48}$  дафний и  $LD_{50}$  мышей (в/б) 28 новых тетраалкиламмониевых производных урацила

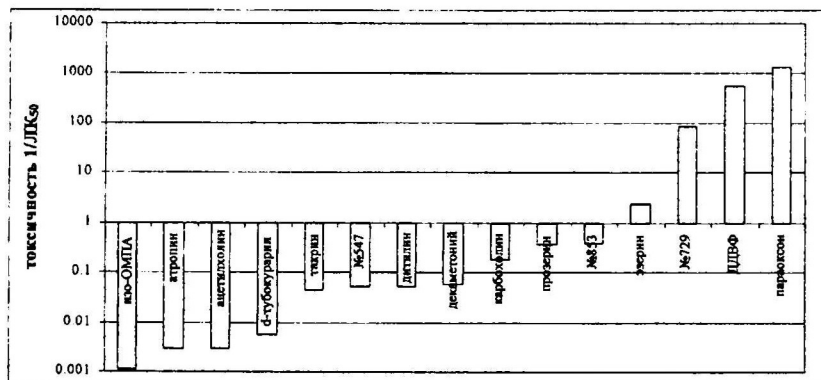


Рис. 2. Токсичность некоторых представителей тетраалкиламмониевых производных урацила (соед. № 547 и № 853) в ряду известных холинотропных агентов на дафниях

**Токсикологическая классификация нового класса ингибиторов холинэстераз.** По уровню токсичности на дафниях тетраалкиламмониевые производные урацила можно условно разделить на 3 группы по классификации H.L.Brooks (Brooks et al., 1973) (рис. 2., рис. 3.):

В 1-ю группу практически нетоксичных соединений (уровень  $d$ -тубокурарина с  $ЛК_{50}^{48}=175.4$  мкМ/л) входят бис-ониевые структуры с тетраэтильными радикалами (соед. А-1, табл. 1.) и с  $\alpha$ -пиридил- $N$ -оксидными циклами (соед. № 792 и № 822, табл. 1.) при ониевых головках.

Во 2-ю группу малотоксичных соединений (уровень декаметония с  $ЛК_{50}^{48}=17.2$  мкМ/л) входит подавляющее большинство изученных нами производных урацила.

В 3-ю группу умеренно токсичных соединений (уровень прозерина с  $ЛК_{50}^{48}=2.7$  мкМ/л) входят бис-ониевые структуры с длинными алифатическими и объемными заместителями в 5-м положении 6-метилурацилового цикла. По результатам опытов на мышах эти же соединения также относятся к умеренно токсичным (Измеров и др., 1973).

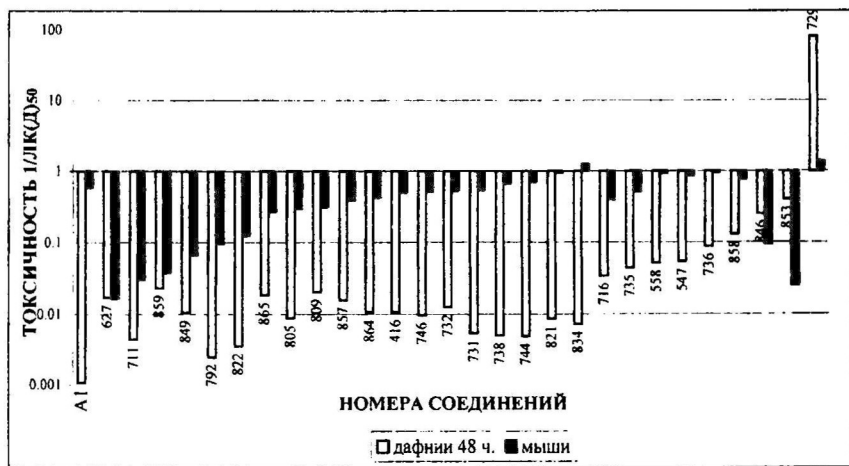


Рис. 3. Токсичность изученных соединений на дафниях ( $1/ЛК_{50}^{48}$ ) и мышах ( $1/ЛД_{50}$ ).

**Хроническая токсичность соединения № 547 на дафниях.** Были изучены эффекты длительного действия малых концентраций соед. № 547, кратных долям 1/100, 1/20, 1/10 и 1/3 от  $LK_{50}^{24}=22.1$  мкМ/л, составляющие 0.2 мкМ/л, 1.2 мкМ/л, 2.4 мкМ/л и 6.0 мкМ/л соответственно.

По мере увеличения концентрации соед. № 547 выживаемость дафний в ряду последовательных поколений падает. В родительском поколении (P) она составляет 90%, 80%, 60% и 10% при концентрациях 0.2 мкМ/л, 1.2 мкМ/л, 2.4 мкМ/л и 6.0 мкМ/л, соответственно. В первом поколении ( $F_1$ ) выживаемость составляет 90%, 60%, 50% и 10%, во втором ( $F_2$ ) - 80%, 55%, 45% и 10%, а в третьем ( $F_3$ ) - 85%, 50%, 20% и 0%. В концентрации 0.2 мкМ/л (1/100 от  $LK_{50}^{24}$ ) соед. № 547 не влияет на выживаемость дафний во всех изученных поколениях (P- $F_1$ - $F_2$ - $F_3$ ).

В условиях однократной затравки соед. № 547 в концентрациях 1.2, 2.4 и 6.0 мкМ/л только одного родительского поколения (P) изменения плодовитости дафний в ряду P- $F_1$ - $F_2$ - $F_3$  отличаются от контрольных показателей ASTM (Annual Book..., 1993) в прямо-пропорциональной зависимости от величины действующей концентрации. В режиме постоянной затравки соед. № 547 всех 4-х поколений дафний подавление плодовитости рачков в ряду поколений P- $F_1$ - $F_2$ - $F_3$  значительно более выражено. Концентрация 0.2 мкМ/л не влияет на плодовитость дафний во всех изученных поколениях - P- $F_1$ - $F_2$ - $F_3$ , оставаясь на уровне контрольных 60-70 экз/самку.

Таким образом, концентрация 0.2 мкМ/л (1/100 от  $LK_{50}^{24}$ ) для соед. №547 может считаться безопасной (NOEC) для дафний, т.е. не влияющей в условиях длительной затравки на выживаемость и плодовитость в ряду 4-х поколений.

**Влияние соед. №547 на активность АХЭ гомогената *Daphnia magna*.**  
Концентрация, угнетающая активность АХЭ гомогената дафний на 50% -

$I_{50} = 188$  мкМ/л, а, по полученным на дафниях в острых экспериментах данным, значение токсичности соед. № 547  $ЛК_{50}^{24} = 22.1$  мкМ/л.

Величина соотношения  $I_{50}/ЛК_{50}$  является характеристичной, и для высокотоксичных ингибиторов холинэстеразы паратиона, дихлофоса, алдикарба на дафниях составляет 0.26, 0.73 и 0.42, соответственно (Sturm, Hansen, 1999). Т.е. ингибирование фермента предшествует и, вероятно, является причиной гибели дафний. В случае соед. № 547, его среднесмертельная концентрация в 8.5 раз меньше концентрации, ингибирующей АХЭ дафний на 50% *in vitro* - соотношение  $I_{50}/ЛК_{50} = 8.5$ , т.е. ингибирование фермента развивается уже после гибели дафний и, вероятно, не является ее причиной. Эффективность взаимодействия 1,3-бис[ω-(диэтил-орто-нитробензиламмоний) пентил]-6-метилурацил дибромида (соед. № 547) с АХЭ *Daphnia magna* ( $k_2 = 1.2 \times 10^2$  М<sup>-1</sup>мин<sup>-1</sup>) в 1000000 раз ниже эффективности взаимодействия с АХЭ эритроцитов быка ( $k_2 = 6.4 \times 10^8$  М<sup>-1</sup>мин<sup>-1</sup>) и в 1000 раз ниже эффективности взаимодействия с БУХЭ сыворотки крови лошади ( $k_2 = 4.9 \times 10^4$  М<sup>-1</sup>мин<sup>-1</sup>) (Аникиенко и др., 2000; Резник и др., 1998).

**Фармакологический анализ механизма токсического действия соед. №547 на дафниях.** В качестве эффекта регистрировали острую токсичность ( $ЛК_{50}$ ) за 24 часа контакта дафний с композицией «агент + соед. №547».

Атропин в диапазоне концентраций 1/7-1/280 от  $ЛК_{50}^{48}$ , д-тубокурарин в диапазоне концентраций 1/6-1/240 от  $ЛК_{50}^{48}$ , а также селективный ингибитор БУХЭ изо-ОМПА в диапазоне концентраций 1/2.5 - 1/200 от  $ЛК_{50}^{48}$  не влияют на токсичность соед. № 547 на дафниях. Соед. №547 в диапазоне концентраций 1/2.5-1/80 от  $ЛК_{50}^{48}$  не изменяет токсичности гидролизуемого холинэстеразами миорелаксанта дитилина. Это можно интерпретировать как свидетельство отсутствия у соед. № 547 спо-

способности ингибировать холинэстеразу дафний до физиологически (функционально) значимых для выживания величин.

**Оценка острой токсичности некоторых ониевых производных 6-метилурацила на батареях биотестов «гидробионты-млекопитающие».**

В батарею биотестов вошли стандартные лабораторные культуры *Paramecium caudatum* и *Daphnia magna*, а также коммерческие наборы микро-биотестов (предоставлены к.б.н. Н.Ю.Степановой) «Algotoxkit F<sup>TM</sup> (*Selenastrum capricornutum*-одноклеточная водоросль)», «Protoxkit F<sup>TM</sup> (*Tetrachymena thermophila*-простейшее), «Rotoxkit F (*Brachionus calyciflorus*-коловратка)», «Thamnatokit F (*Thamnocephalus platyurus*-пресноводный рачок)».

В качестве модельных соединений нами были избраны: (1) соед. № 547, как одно из наиболее эффективных на млекопитающих и умеренно-токсичное на дафниях, (2) соед. № 858, № 846 и № 853, как наиболее токсичные на дафниях, (3) соед. № 627 и № 857 – моно-ониевые аналоги соед. № 547, показавшие на мышах существенную разницу в уровнях токсичности (23 крат).

Наименее токсикорезистентным видом к соед. № 547, № 858, № 846, № 853 оказалась пресноводная коловратка *Brachionus calyciflorus* (табл. 2.). Наиболее резистентными к соед. № 547, № 858, № 846, а также № 853 оказались инфузории *Paramecium caudatum* и *Tetrachymena thermophila*, соответственно.

Из таблицы 2 видно, что при увеличении длины полиметиленовой цепочки в 5-ом положении урацилового цикла с R<sub>2</sub>=H (соед. № 547) до C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> (соед. № 858), C<sub>10</sub>H<sub>21</sub> (соед. № 846) и C<sub>16</sub>H<sub>33</sub> (соед. № 853) на гидробионтах (водоросли - 1 вид, простейшие – 2 вида, коловратки – 1 вид коловратки, ракообразные – 2 вида) отмечена четкая тенденция к увеличению токсичности до 7-21 крат по сравнению с токсичностью соед. № 547.

Таблица 2.

Токсичность некоторых бис- и моно- оиевых производных 6-метилурацила (95% CI, n=6 опытов) на различных микробиотестах и мышах

	№ 547	№ 858	№846	№ 853	№ 627	№ 857
Thamnotoxkit F	24.5	13.8 <sup>a</sup>	0.8 <sup>b</sup>	0.2 <sup>a</sup>	64.8	68.7
ЛК <sub>50</sub> <sup>24</sup> , мкМ/л	20.1 ÷ 29.3	9.8 ÷ 17.6	0.7 ÷ 1.2	0.1 ÷ 0.4	56.7 ÷ 72.3	60.1 ÷ 75.4
D. magna	18.7	7.8 <sup>a</sup>	4.0 <sup>b</sup>	2.5 <sup>a</sup>	58.9	64.3
ЛК <sub>50</sub> <sup>48</sup> , мкМ/л	14.6 ÷ 23.9	6.0 ÷ 10.1	3.1 ÷ 5.2	2.0 ÷ 3.2	44.6 ÷ 77.7	47.3 ÷ 87.5
Protoxkit F <sup>TM</sup>	74.7	15.1 <sup>a</sup>	10.4 <sup>b</sup>	4.4 <sup>a</sup>	203.3	197.1
IC <sub>50</sub> <sup>24</sup> , мкМ/л	47.2 ÷ 117.2	11.3 ÷ 19.8	5.2 ÷ 15.7	1.2 ÷ 7.8	175.4 ÷ 231.7	168.2 ÷ 229.4
P. caudatum	159.7	87.7 <sup>a</sup>	20.1 <sup>b</sup>	нет	нет	нет
EC <sub>50</sub> <sup>1</sup> , мкМ/л	101.5 ÷ 207.8	68.1 ÷ 103.2	14.7 ÷ 25.3			
Rotoxkit F	1.6	0.9 <sup>a</sup>	0.4 <sup>b</sup>	0.2 <sup>a</sup>	193.6	207.2
ЛК <sub>50</sub> <sup>24</sup> , мкМ/л	1.1 ÷ 1.9	0.5 ÷ 1.2	0.3 ÷ 0.6	0.1 ÷ 0.3	167.5 ÷ 227.3	181.3 ÷ 241.1
Algaltoxkit F <sup>TM</sup>	4.8	2.7 <sup>a</sup>	0.4 <sup>b</sup>	0.2 <sup>a</sup>	13.8	11.8
IC <sub>50</sub> <sup>72</sup> , мкМ/л	2.0 ÷ 7.3	1.1 ÷ 3.2	0.2 ÷ 0.6	0.1 ÷ 0.3	8.7 ÷ 20.3	6.3 ÷ 17.7
Мыши	1.2	1.3	10.8 <sup>b</sup>	39.7 <sup>a</sup>	60.3	2.6 <sup>c</sup>
ЛД <sub>50</sub> , мкМ/кг	0.9 ÷ 1.5	1.0 ÷ 1.7	8.3 ÷ 14.0	31.1 ÷ 50.9	45.7-79.6	1.9 ÷ 3.6

<sup>a</sup> — значимое различие (p<0.05) между №547 и №858; <sup>b</sup> — значимое различие (p<0.05) между №846 и №853; <sup>c</sup> — значимое различие (p<0.05) между №627 и №857; нет — нет дан-

ных

Это свидетельствует о тесной связи между липофильными свойствами молекул с длинными углеводородными радикалами и их токсичностью для гидробионтов.

По данным таблицы 2 видно, что на гидробионтах разница между уровнями токсичности соед. № 627 и № 857 отсутствует ( $p < 0.05$ ), тогда как на мышах это различие 23 кратное. Следовательно, молекулярная организация биомишеней, с которыми взаимодействуют изученные моно-ониевые производные 6-метилурацила у гидробионтов и у млекопитающих существенно отличается.

## ВЫВОДЫ

1. Охарактеризована биологическая активность нового класса селективных ингибиторов ацетилхолинэстеразы (НФ 3.1.1.7) - 28 тетраалкиламмониевых производных урацила и 6-метилурацила на батарее биотестов «гидробионты - млекопитающие». Показано, что острая токсичность 28 изученных моно- и бис-тетраалкиламмониевых производных урацила на *Daphnia magna* находится в диапазоне  $LK_{50}^{48 \text{ часов}} = \text{от } 2.5 \text{ до } 400.0 \text{ мкМ/л}$  («нетоксичные-умеренно-токсичные агенты» по H.L. Brooks). Исключительно высокую острую токсичность на *Daphnia magna* проявляет фосфорорганическое тиофосфоновое производное 6-метилурацила с  $LK_{50}^{48} = 0.01 \text{ мкМ/л}$ .
2. Острая токсичность ( $1/LK_{50}$ ) известных холинотропных агентов на лабораторной культуре *Daphnia magna* возрастает в ряду (в мкМ/л): «изо-ОМПА ( $LK_{50}^{48}=915.2$ ) – атропин ( $LK_{50}^{48}=335.8$ ) - d-тубокурарин ( $LK_{50}^{48}=175.4$ ) — дитилин ( $LK_{50}^{48}=18.6$ ) - декаметоний ( $LK_{50}^{48}=17.2$ ) — карбахоллин ( $LK_{50}^{48}=5.5$ ) – прозерин ( $LK_{50}^{48}=2.7$ ) – эзерин ( $LK_{50}^{48}=0.57$ ) – параоксон ( $LK_{50}^{48}=0.0008$ )».



3. Максимальную острую токсичность на лабораторных культурах *Daphnia magna*, *Paramecium caudatum*, а также на коммерческих тест-наборах «Algotoxkit F<sup>TM</sup> (*Selenastrum capricornutum*)», «Protoxkit F<sup>TM</sup> (*Tetrachymena thermofila*)», «Rotokit F (*Brachionus calyciflorus*)», «Thamnatoxkit F (*Thamnocephalus platyurus*)» в ряду изученных гомологов 6-метилурацила проявляют бис-тетраалкиламмониевые структуры с длинными (C<sub>10</sub>, C<sub>16</sub>) алифатическими заместителями в 5-м положении 6-метилурацилового цикла, а именно, соед. № 846 и № 853 с ЛК<sub>50</sub><sup>48</sup> от 0.2 до 20.1 мкМ/л.
4. Моно-тетраалкиламмониевые структуры (соед. № 627 и № 857) с аммонииалкильными фрагментами при N<sub>1</sub> и N<sub>3</sub> атомах 6-метилурацилового цикла проявляют на *Daphnia magna* идентичную токсичность (ЛК<sub>50</sub><sup>48</sup> час=58.9-64.3 мкМ/л); на белых мышах их токсичность различается в 23 раза (ЛД<sub>50</sub> = 60.3 и 2.6 мкМ/кг, соответственно).
5. Требования к молекулярному устройству активных на *Daphnia magna* тетраалкиламмониевых производных урацила отличны от таковых на мышах; корреляция токсикометрических данных на *Daphnia magna* и мышах отсутствует.
6. Наибольшую чувствительность к ряду бис-тетраалкиламмониевых структур (соед. № 547, № 858, № 853 и № 846) демонстрируют пресноводная коловратка (*Brachionus calyciflorus*) и одноклеточная водоросль (*Selenastrum capricornutum*). Наименьшая чувствительность характерна для простейших (*Tetrachymena thermofila* и *Paramecium caudatum*). Чувствительность пресноводных рачков (*Daphnia magna* и *Thamnocephalus platyurus*) занимает промежуточное положение.
7. Эффективность взаимодействия 1,3-бис[ω-(диэтил-орто-нитробензиламмоний)-пентил]-6-метилурацил дибромида (соед. № 547) с АХЭ *Daphnia magna* (k<sub>2</sub>=1.2×10<sup>2</sup> М<sup>-1</sup>мин<sup>-1</sup>) в 1000000 раз ниже эффектив-

ности взаимодействия с АХЭ эритроцитов быка ( $k_2=6.4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ) и в 1000 раз ниже эффективности взаимодействия с БУХЭ сыворотки крови лошади ( $k_2=4.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{мин}^{-1}$ ). Агенты с холинотропным механизмом действия (атропин, d-тубокурарин, дитилин, изо-ОМПА) не влияют на токсичность соед. № 547 на *Daphnia magna*.

8. Величина НОЕС соед. № 547 составляет 0.2 мкМ/л (1/100 от ЛК<sub>50</sub><sup>24</sup>) и характеризуется отсутствием эмбриотоксических эффектов в 4-х последовательных поколениях *Daphnia magna* (P-F<sub>1</sub>-F<sub>2</sub>-F<sub>3</sub>).

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Зобов В.В., Березинский Л.А., Резник В.С. Исследование токсичности представителя нового класса ингибиторов ацетилхолинэстеразы (соед. № 547) на *Daphnia magna* /Труды 4-й Всерос. научно-практ. конф. «Новое в экологии и безопасности жизнедеятельности». СПб. - 1999. - Т.3. - С. 282.
2. Березинский Л.А., Зобов В.В., Резник В.С. Оценка эффективности производных нового класса ингибиторов холинэстераз на дафниях и мышцах/Тезисы докл. на VI Всерос. школе молодых ученых «Актуальные проблемы нейробиологии». – Казань. 1999. - С. 34-36.
3. Березинский Л.А., Зобов В.В. Изучение холинергических агентов на *Daphnia magna* Straus // Вестник Татарстанского отделения Российской экологической академии. – 1999. - №2, С. 35-36.
4. Степанова Г.С., Зобов В.В., Петрова Л.М, Латыпова В.З., Березинский Л.А, Романов А.Г., Степанова Н.Ю. Исследование токсичности химических поллютантов на *Daphnia magna* (Straus) // Токсикологический Вестник. - 1999. - №3. - С.22-27.

5. Березинский Л.А., Зобов В.В., Акамсин В.Д., Галяметдинова И.В. Фармакологический анализ токсичности соединения № 547 на *Daphnia magna* / Тезисы докл. на VI Всерос. школе молодых ученых «Актуальные проблемы нейробиологии». – Казань. 2000. - С. 26-27.
6. Березинский Л.А., Степанова Н.Ю., Зобов В.В., Акамсин В.Д. Биологическая активность производных нового класса ингибиторов холинэстераз на батарее микробiotестов / Тезисы докл. на VI Всерос. школе молодых ученых «Актуальные проблемы нейробиологии». – Казань. 2000. - С. 27-28.
7. Березинский Л.А., Зобов В.В., Латыпова В.З., Резник В.С. Токсичность тетраалкиламмониевых производных 6-метилурацила на *Daphnia magna* (S) и мышах. / Труды 4-й Всерос. научно-практ. конф. «Новое в экологии и безопасности жизнедеятельности». СПб.- 2000. - Т. 2. - С. 297.
8. Березинский Л.А., Зобов В.В., Латыпова В.З., Акамсин В.Д. Токсичность представителей нового класса высокоселективных ингибиторов ацетилхолинэстеразы на *Daphnia magna* (Straus) и мышах. // Вестник Татарстанского отделения Российской экологической академии, 2000. - №3. – С.33-35.
9. Зобов В.В., Березинский Л.А., Бузукина И.В., Резник В.С., Акамсин В.Д., Галяметдинова И.В., Латыпова В.З. Токсичность нового тетраалкиламмониевого производного 6-метилурацила (соед. № 547) на *Daphnia magna* и млекопитающих // Экологическая химия, 2000 (в печати).

2-00

Отпечатано в ООО «СИДДХИ-СЕКЬЮРИТИ».  
Казань, ул. Журналистов, 1/16, офис 211. Тел. (8432) 76-74-59  
Лицензия №0130 от 1.08.98 г.  
Заказ №315. Тираж 100 экз.  
Формат 60х84/1. Бумага офсетная. Печать – ризография.